

09/831907
531 Rec'd PCT/ 25 MAY 2001

DOCKET NO.: 208888US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: BEAUVILLAIN Jean-Claude et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR99/02941

INTERNATIONAL FILING DATE: November 26, 1999

FOR: MAMMALIAN UROTENSINS II AND APPLICATIONS THEREOF

REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Assistant Commissioner for Patents

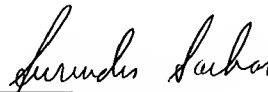
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EJU

INPI 99/831907
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

REC'D 28 DEC 1999

WIPO — PCT

BREVET D'INVENTION

FR99/2941

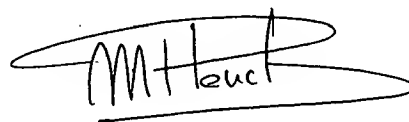
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 DEC. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÉGLE
17.1.a) OU b)



Martine PLANCHE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

26 - 11 - 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 14914 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75

DATE DE DÉPÔT

26 NOV. 1998

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET ORES

6 avenue de Messine
75008 PARIS

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

BLOcp598/25FR

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

UROTENSINES II DE MAMMIFERES ET LEURS APPLICATIONS.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE-INERM

Forme juridique

Etablissement public

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

Pays

101 rue de Tolbiac, 75654 PARIS Cedex 13

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

5814 514

TITRE DE L'INVENTION : UROTENSINES II DE MAMMIFERES ET LEURS APPLICATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6 avenue de Messine
75008 PARIS (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BEAUVILLAIN Jean-Claude
47 bis rue Wattrelot, 59175 TEMPLE EMBLEMARS (FRANCE)

COULOUARN Yolaine
24 allée Arromanches, Appt B106, 76000 ROUEN (FRANCE)

JEGOU Sylvie
4 Impasse Tabouret, 76000 ROUEN (FRANCE)

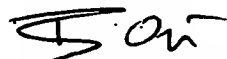
LIHRMANN Isabelle
19 rue de la Haizette, 27310 SAINT OUEEN DE THOUBERVILLE (FRANCE)

VAUDRY Hubert
36 rue d'Epouville, 76133 MANNEGLISE (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du demandeur (s) ou du mandataire

PARIS, le 26 NOVEMBRE 1998



Béatrice ORES
N° 92-4046

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

La présente invention est relative à des peptides de mammifères, notamment d'origine humaine ou murine, présentant une structure de type urotensine II (UII) (prépro-urotensine II, pro-urotensine II et urotensine II), ainsi qu'à leurs applications en tant que médicament, notamment sous la forme d'une composition destinée
 5 au traitement des maladies neurodégénératives ou des traumatismes de la moelle épinière (hémiplegie, paraplégie) et en tant qu'outil de criblage de médicaments anti-hypertenseurs.

La présente invention est également relative à des séquences d'acides nucléiques codant pour lesdits peptides, à des oligonucléotides compris dans
 10 lesdites séquences, et à l'utilisation desdites séquences comme amorces et comme sondes ou pour l'expression des urotensines II de mammifères et notamment de l'urotensine II humaine ou murine.

L'urotensine II est un neuropeptide qui a d'abord été caractérisé dans l'urophyse des poissons téléostéens. Chez ces poissons, l'urotensine II est un peptide
 15 cyclique comprenant 12 acides aminés. La caractérisation de l'urotensine II chez plusieurs espèces de poissons téléostéens a montré que la structure de l'heptapeptide cyclique C-terminal est conservée, tandis que l'on observe des substitutions dans la partie N-terminale de la molécule. Cet heptapeptide présente la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val (SEQ ID NO:9).

On a longtemps pensé que ce peptide était produit exclusivement dans l'urophyse des poissons téléostéens (4), un petit organe neurohémal présentant des similitudes avec la neurohypophyse, localisé à l'extrémité caudale de la moelle épinière ; toutefois, il est apparu que ce neuropeptide n'est pas confiné au système neurosecrétoire caudal du poisson. Il a également été isolé à partir d'extraits de
 25 cerveaux de truite, de raie (5) ou de lamproie (6). En outre, un peptide similaire à l'urotensine II de poisson a été détecté dans le système nerveux central (SNC) de la grenouille (*Rana ridibunda*) (7) et chez un gastéropode (*Aplysia californica*), au niveau du ganglion cérébral (8).

Ce peptide, qui comprend chez la grenouille, 13 acides aminés,
 30 présente des similarités de structure avec les urotensines II de poisson, et notamment la région cyclique contenant l'heptapeptide précité.

Ce neuropeptide, présente également des similarités avec la somatostatine (3,4) ; toutefois, l'urotensine II de poisson présente essentiellement des effets cardiovasculaires, que l'on peut également observer lorsque cette urotensine est administrée à un mammifère, tel que le rat ou la souris (11, 12, 13) : effet contractile sur les artères (action observée chez le rat (11) et le lapin (12)), contraction des muscles lisses (effet spasmogène sur certains muscles lisses (vessie et iléum), chez les amphibiens (26)), effets sur le rythme cardiaque (observés chez les amphibiens (26)).

Il a également été montré que l'urotensine II de poisson est exprimée sous la forme de précurseurs, dont les structures primaires ont été déterminées à partir du système neurosécrétoire caudal de la carpe (*Cyprinus carpio*) (17).

Chez les mammifères, aucune protéine de la famille de l'urotensine II n'a été décrite jusqu'à présent.

Les Inventeurs ont trouvé, de manière inattendue, qu'une urotensine II était exprimée chez les mammifères, notamment chez l'homme et chez les murins et qu'elle pouvait présenter, chez l'homme une activité sur la survie et/ou la régénération des motoneurones et sur la pression artérielle (hypertension).

La présente invention a pour objet des peptides, isolés de mammifères, caractérisés en ce qu'ils comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa (SEQ ID NO:9) dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine.

La similarité est quantifiée à l'aide du logiciel Clustal®, notamment accessible sur l'Internet (site <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>).

La présente invention englobe en particulier :

- la prépro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:1), la pro-urotensine II humaine (SEQ ID NO:2) et l'urotensine II humaine (SEQ ID NO:3),

- la prépro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:30), la pro-urotensine II de rat (SEQ ID NO:31) et l'urotensine II de rat (SEQ ID NO:32),

- la prépro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:33), la pro-urotensine II de souris (SEQ ID NO:34) et l'urotensine II de souris (SEQ ID NO:35).

Ces séquences polypeptidiques de mammifères présentent globalement une faible similarité avec les séquences de poisson ou de grenouille (figure 1 et figure 4) :

- 16 % de similarité entre la prépro-UII- α ou la prépro-UII- γ de carpe et la prépro-UII humaine ;

- 25 % de similarité entre la prépro-UII de grenouille et la prépro-UII humaine.

Au niveau N-terminal de l'UII humaine, ces séquences ne présentent aucune similarité avec les UII de non-mammifères antérieurement décrites.

L'invention englobe également des polypeptides ou des peptides dérivés des urotensines II de mammifère et de leurs précurseurs, selon l'invention, par addition, délétion ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés ; il peut s'agir par exemple de polypeptides dans lesquels des modifications ont été apportées, notamment par substitution des acides aminés dextrogyres par des acides aminés levogyres (pseudopeptides) ou de polypeptides obtenus par modélisation moléculaire et présentant une activité d'urotensine II au niveau de la jonction neuromusculaire ou des autres cibles biologiques de l'urotensine II.

La présente invention a également pour objet un fragment d'acide nucléique purifié, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour une urotensine II de mammifère telle que définie ci-dessus ou de sa séquence complémentaire, sens ou anti-sens.

Dans ce cadre, la présente invention englobe en particulier les ADNc, les ARNm et les ADN génomiques des urotensines II et de leurs précurseurs.

Elle englobe en particulier les séquences suivantes :

* séquences humaines :

- la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, de séquence SEQ ID NO:4, qui comprend 551 pb et dans laquelle :

- le segment 1-32 est une séquence non-codante,

. le segment 33-407 code pour la prépro-urotensine II humaine, le segment 33-92 correspondant à la séquence codant pour le peptide signal et

. le segment 408-551 est non-codant (voir figure 2),

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine (séquence SEQ ID NO:5), caractérisé en ce qu'il code pour la pro-urotensine II humaine, le précurseur de l'urotensine humaine et correspond au segment 93-407 de la SEQ ID NO:4;

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine (séquence SEQ ID NO:6), caractérisé en ce qu'il code pour l'urotensine II humaine et correspond au segment 372-407 de la séquence SEQ ID NO:4 ;

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, codant pour un dipeptide (Pro-Tyr), en amont du site de clivage tribasique, lui-même situé juste en amont de la séquence codant pour l'urotensine II humaine et spécifique de ladite séquence humaine (voir figure 2) ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces constitués de 20 à 50 nucléotides de SEQ ID NO:4 et notamment les séquences SEQ ID NO: 7-8 et 10-17 et plus particulièrement les paires d'amorces suivantes :

. les séquences SEQ ID NO:7 et NO:8, correspondant respectivement aux segments 267-292 et 535-511 de la séquence SEQ ID NO:4 ;

. les séquences SEQ ID NO:10 et 11 correspondant respectivement aux positions 198-216 et 381-404 de la séquence ID NO:4 ;

. les séquences SEQ ID NO:12 et SEQ ID NO:13, correspondant respectivement aux positions 46-65 et 214-195 de la séquence SEQ ID NO:4 ;

. les séquences SEQ ID NO:14 (positions 9-28 de la séquence SEQ ID NO:4) et SEQ ID NO:13 ;

. les séquences SEQ ID NO:15 (positions 14-33 de la séquence SEQ ID NO:4) et SEQ ID NO:13 ;

. les séquences SEQ ID NO:12 et SEQ ID NO:16 (positions 150-131 de la séquence SEQ ID NO:4) ;

. les séquences SEQ ID NO:17 (positions 8-27 de la séquence SEQ ID NO:4) et SEQ ID NO:13.

- des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:4 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:4. Lesdites sondes sont de préférence utilisées dans les conditions d'hybridation suivantes :

. hybridation : 5X SSPE (0,9 M NaCl/0,05 M tampon sodium phosphate, pH 7,7/0,005 M EDTA), 0,1 % SDS, 10X Denhardt's (0,2 % Ficoll/0,2 % polyvinylpyrrolidone/0,2 % BSA), 50 µg/ml ARNt, 50 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé. 37°C, une nuit.

. lavages : 5X SSPE/0,1 % SDS, 4 fois 5 minutes, température ambiante, 3X SSPE/0,1 % SDS, 2 fois 10 minutes, 30°C.

10 * séquences de rat :

- la séquence codant pour la prépro-urotensine II de rat, de séquence SEQ ID NO:18, qui comprend 529 pb et dans laquelle :

. le segment 1-36 est une séquence non-codante,

. le segment 37-405 code pour la prépro-urotensine II de rat, le
15 segment 37-96 correspondant à la séquence codant pour le peptide signal et

. le segment 406-529 est non-codant (voir figure 3),

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de rat (séquence SEQ ID NO:19), caractérisé en ce qu'il code pour la pro-urotensine II de rat, le précurseur de l'urotensine de rat et correspond au segment 96-405 de la SEQ ID
20 NO:18 ;

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de rat (séquence SEQ ID NO:20), caractérisé en ce qu'il code pour l'urotensine II de rat et correspond au segment 364-405 de la séquence SEQ ID NO:18 ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces constitués de 20 à 50
25 nucléotides de SEQ ID NO:18 et notamment les séquences SED ID NO :36-42 et plus particulièrement les paires d'amorces suivantes :

. les séquences SEQ ID NO:36 et SEQ ID NO:37, correspondant respectivement aux positions 295-314 et 504-485 de la séquence SEQ ID NO:18 ;

. les séquences SEQ ID NO:38 (positions 280-299 de la séquence
30 SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:37 ;

. les séquences SEQ ID NO:39 (positions 131-150 de la séquence SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:40 (positions 314-295 de la SEQ ID NO:18) ;

. les séquences SEQ ID NO:41 (positions 322-341 de la séquence SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:37 ;

5 . les séquences SEQ ID NO:42 (positions 50-69 de la SEQ ID NO:18) et SEQ ID NO:40.

- des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:18 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:18, notamment la SEQ ID NO:43 (positions 192-221 de la séquence SEQ ID NO:18).

10 * séquences de souris

- la séquence codant pour la prépro-urotensine II de souris, de séquence SEQ ID NO:27, qui comprend 539 pb et dans laquelle :

. le segment 1-36 est une séquence non-codante,

15 . le segment 37-405 code pour la prépro-urotensine II de souris, le segment 37-96 correspondant à la séquence codant pour le peptide signal et

. le segment 406-539 est non-codant (voir figure 4),

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de souris (séquence SEQ ID NO:28), caractérisé en ce qu'il code pour la pro-urotensine II de souris, le précurseur de l'urotensine de souris et correspond au segment 97-405 de
20 la SEQ ID NO:27 ;

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II de souris (séquence SEQ ID NO:29), caractérisé en ce qu'il code pour l'urotensine II de souris et correspond au segment 355-405 de la séquence SEQ ID NO:27 ;

25 - des fragments, aptes à servir d'amorces constitués de 20 à 50 nucléotides de SEQ ID NO:27 et notamment les séquences SEQ ID NO:21-26 et plus particulièrement les paires d'amorces suivantes :

. les séquences SEQ ID NO:21 et SEQ ID NO:22, correspondant respectivement aux positions 295-314 et 485-504 de la séquence SEQ ID NO:27 ;

30 . les séquences SEQ ID NO:23 (positions 280-299 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

. les séquences SEQ ID NO:24 (positions 131-150 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

. les séquences SEQ ID NO:25 (positions 295-314 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

5 . les séquences SEQ ID NO:24 et SEQ ID NO:26 (positions 322-341 de la séquence SEQ ID NO:27).

- des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:27 et notamment la séquence SEQ ID NO :44 (positions 204-233 de la séquence SEQ ID
10 NO:27).

Les conditions d'hybridation des sondes murines sont similaires à celles exposées ci-dessus, pour les séquences humaines.

Compte tenu des données à la disposition des Inventeurs, il n'était pas évident que les mammifères puissent exprimer une urotensine II et que cette
15 dernière exerçât effectivement d'autres effets que des effets cardiovasculaires.

Lesdits polypeptides et peptides peuvent être produits, soit en exprimant les séquences d'acides nucléiques telles que définies ci-dessus dans des cellules hôtes, soit par synthèse, et notamment par synthèse selon la technique de Merrifield.

20 Les séquences nucléiques ci-dessus définies ont comme première application de détecter soit la présence ou l'absence de l'ARNm codant pour une urotensine II de mammifère et notamment pour l'urotensine II humaine dans des échantillons biologiques (biopsies, par exemple), notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière, soit de détecter
25 une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine (comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon l'invention).

Les séquences nucléiques ci-dessus définies ont comme deuxième application, la production de vecteurs aptes à exprimer les précurseurs de l'urotensine II humaine, notamment dans le cadre d'une thérapie génique ciblée.

30 La présente invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un peptide tel

que défini ci-dessus ou une séquence d'acides nucléiques codant pour tout ou partie desdits peptides, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De manière préférée, lesdites compositions sont administrées par voie intrathécale. Elles permettent en particulier de traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière, en particulier les maladies de la plaque neuromusculaire et plus particulièrement les maladies amyotrophiques, telles que la sclérose latérale amyotrophique ou les traumatismes de la moelle épinière.

La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation d'une pro-urotensine II ou d'une urotensine II, quelle que soit son origine (vertébrés ou invertébrés, par exemple) pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière ou amyotrophies spinales.

La présente invention a, également, pour objet un kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence selon l'invention, apte à détecter la présence d'un ARNm, éventuellement modifié, codant pour une urotensine II de mammifère dans un échantillon biologique.

La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation desdits peptides, qui présentent également une activité hypertensive pour la sélection d'antagonistes de cette activité (sélection d'anti-hypertenseurs présentant une activité à l'encontre des urotensines II selon l'invention).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'alignement des séquences en acides aminés déduites respectivement des prépro-UII humaine, de grenouille et de carpe. Dans cette figure, la séquence signal est indiquée en italique ; les acides aminés conservés sont indiqués en noir ; les sites de clivage de la prohormone sont indiqués par des étoiles et les résidus acides conservés sont indiqués par un cercle noir. Le pont disulfure présent dans la séquence de l'UII est indiqué sous la séquence de l'urotensine. Les acides aminés sont numérotés sur la droite de la figure ;

- la figure 2 illustre la structure des prépro-UII, pro-UII et UII humaines ;

- la figure 3 illustre la structure des prépro-UII, pro-UII et UII de rat ;

5 - la figure 4 illustre la structure des prépro-UII, pro-UII et UII de souris ;

- la figure 5 illustre la distribution tissulaire de l'ARNm de la prépro-UII humaine. La figure 5A illustre l'analyse en *dot blot* de l'expression de l'ARNm de la prépro-UII dans différents tissus humains, en utilisant le Masterblot de
 10 Clontech (ARN poly(A) de 50 tissus humains différents (80-448 ng/point, standardisé en utilisant le taux d'expression en ARN de 8 gènes domestiques). Les contrôles positifs consistent en ADN génomique humain ; les contrôles négatifs incluent de l'ADN ou de l'ARN de levure ou d'*E. coli* ainsi que des séquences génomiques répétées humaines (H). Le *blot* est hybridé avec la sonde d'ADNc codant pour la prépro-UII
 15 humaine et exposé pendant 2 jours à un film X-Omat. La figure 5B illustre l'analyse en Northern Blot de l'expression de l'ARNm de prépro-UII dans la moelle épinière humaine ; 2 µg d'ARNm poly(A) de moelle épinière sont hybridés avec la sonde constituée par l'ADNc de la prépro-UII humaine. La taille est déterminée en utilisant des marqueurs de taille des ARN (chaînes de nucléotides standards calibrés). La figure
 20 5C correspond à des autoradiographies aux rayons X et montre la distribution de l'ARNm de la prépro-UII dans la moelle épinière humaine. Les sections frontales sont hybridées avec une ribosonde prépro-UII anti-sens (1) ou sens (2) et exposées pendant 10 jours à des films sensibles aux rayons X ;

- la figure 6 est une comparaison des structures primaires de
 25 l'urotensine II de différentes espèces. Des tirets ont été introduits pour que les séquences présentent un alignement optimal. Les points illustrent les identités de résidus d'acides aminés entre les différentes séquences, par rapport à la séquence humaine.

- la figure 7 illustre la distribution tissulaire de l'ARNm de la
 30 prépro-UII de rat et de souris.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE :

5

- Matériel et Méthodes

* Isolement de l'ADNc de la prépro-UII humaine :

Une séquence EST (*expressed sequence tag*) codant pour un peptide ayant une certaine identité avec l'urotensine II de grenouille est enregistrée sous le n° AA535545 (Genbank). Cette séquence dérive d'une analyse EST de clones d'ADNc obtenus à partir de tumeurs du colon.

10

Deux amorces (5'-AACCCAAGAGGAAATTTGAGAAAGTT-3' (SEQ ID NO:7) et 5'-CCAGGTAACAATGAACAGGGTGTAG-3' (SEQ ID NO:8)) déduites de la séquence EST permettent de synthétiser un fragment de 269 pb par RT-PCR à partir d'un échantillon de tumeur du colon humain, dans les conditions suivantes :

15

94°C, 4 min, 1X ; 94°C, 1 min ; 55°C, 1 min ; 72°C, 1 min, 30X ; 72°C, 5 min, 1X.

20

Le produit de la PCR est marqué avec des [³²P] dCTP par amorçage aléatoire, puis hybridé avec différents tissus humains contenant des ARN poly(A) ainsi qu'avec des contrôles positifs et négatifs (MasterBlot, Clontech, Palo Alto). L'hybridation et les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes :

* préhybridation : incubation à 42°C, au moins 5 heures dans un milieu réactionnel comprenant :

50 % formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's, 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 200 µg/ml ADN de sperme de saumon, 0,1 % SDS.

25

* hybridation : même milieu que le milieu de préhybridation avec la sonde marquée en plus.

* lavages : 4 fois 5 minutes à température ambiante, 2X SSC + 0,1 % SDS, puis 2 fois 10 minutes à 42°C, 0,1 % SDS + 0,1 % SDS.

30

Le blot est exposé à un film X-OMAT (Kodak) et les signaux d'hybridation sont quantifiés à l'aide du logiciel Densylab (Bioprobe Systems,

France).

Le signal d'hybridation le plus important est obtenu dans la moelle épinière.

Dans ces conditions, l'ARN poly(A) de moelle épinière humaine (Clontech) est utilisé pour l'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc d'UII humaine avec un kit RACE (kit d'amplification Marathon cDNA, Clontech).

* Analyse en Northern blot (transfert d'ARN sur membrane) :

2 µg d'ARN poly(A) de moelle épinière humaine (Clontech) sont déposés sur gel d'agarose-formaldéhyde ; après migration, on procède à un transfert sur membrane de nylon et à une hybridation avec le produit de la PCR spécifique de l'ADNc de l'UII humaine marqué par incorporation de [³²P] dCTP.

* Hybridation in situ :

Des ribosondes sens et anti-sens humaines sont préparées par transcription *in vitro* des produits de la PCR obtenus avec des amorces prépro-UII spécifiques 5'-CTGCCAGAGATGCTGGGTG-3' (SEQ ID NO:10) et 5'-GACACAGTATTTCCAGAAGCAATC-3' (SEQ ID NO:11) étendues à leur extrémité 5'-terminale avec les promoteurs SP6 et T7 des ARN polymérases correspondantes ; la transcription est réalisée en présence de [³⁵S]UTP (Amersham) ou de digoxigénine-11-UTP (Boehringer), et de T3 ou T7 ARN polymérase, dans les mêmes conditions de PCR que celles exposées ci-dessus.

Une portion de moelle épinière cervicale humaine a été obtenue par autopsie d'un sujet de sexe masculin âgé de 70 ans.

Le fragment de tissu est fixé dans du formaldéhyde 4 % pendant 24 heures, inclus dans du Tissue-Tek et congelé dans de l'azote liquide.

Des sections frontales (12 µm d'épaisseur) sont coupées à l'aide d'un cryostat et conservées à -80°C.

Les sections sont prétraitées comme décrit dans H. Tostivint et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 12605-12610) et recouvertes d'un tampon de préhybridation (50 % formamide, 0,6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,02 % Ficoll, 0,02 % polyvinylpyrrolidone, 0,1 % BSA, 1 mM EDTA , pH 8,0 , 550 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé, 50 µg/ml d'ARNt de levure).

L'hybridation est réalisée à 55°C pendant une nuit dans le même tampon (à l'exception de la concentration en ADN de sperme de saumon dénaturé : 60 µg/ml), complémenté avec 10 mM de dithiothréitol, du sulfate de dextran à 10 % et des ribosondes dénaturées par la chaleur.

5 Les sondes marquées au ^{35}S et les sondes marquées à la digoxigénine sont diluées dans le tampon d'hybridation pour obtenir une concentration finale de 5.10^6 dpm/ml et 1:100 (v/v), respectivement.

Les coupes sont lavées dans du tampon 2X SSC à 60°C et traitées avec de la RNase A (50 µg/ml) pendant 60 min à 37°C.

10 Cinq lavages dans des conditions stringentes sont effectués dans un tampon 0,1X SSC, 14 mM de β -mercaptoéthanol, 0,05 % de pyrophosphate de sodium à 60°C.

15 Les sections hybridées avec les ribosondes marquées au ^{35}S sont déshydratées dans des solutions d'éthanol comprenant des concentrations croissantes d'acétate de sodium 0,3 M et exposées sur un film Hyperfilm- β max (Amersham) pendant 2 semaines.

20 Les sections hybridées avec les ribosondes marquées à la digoxigénine sont lavées dans un tampon 1 (100 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl, pH 7,5), incubées pendant 30 min dans un tampon de blocage (2 % d'agent bloquant Boehringer dans du tampon 1) et incubées pendant 2 heures dans le tampon 1 contenant 1:500 d'anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline (Boehringer), 1 % de sérum de mouton normal et 0,1 % de Triton X100. Les sections sont rincées deux fois pendant 10 min dans le tampon 1 et 10 min dans le tampon 2 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl et 50 mM MgCl_2 , pH 9,5), puis incubées pendant 3
25 heures dans une solution chromagène consistant en Fast Red TR/Naphtol AS-MX et 3 mM Levamisole (Sigma).

La réaction est arrêtée par rinçage dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Les sections sont examinées avec un microscope (Leitz Orthoplan).

* Séquençage

Le produit de l'amplification est sous-cloné dans un vecteur pGEM-T (Promega) et séquencé avec les amorces SP6 et T7 en utilisant le kit de séquençage Amersham (Thermo Sequenase).

5

- Résultats

* Caractérisation de l'ADNc de prépro-UII humaine :

Le cadre de lecture ouvert des ADNc du précurseur de l'UII humaine code pour une protéine de 124 acides aminés (figure 1 et figure 2).

L'organisation des précurseurs UII humains est similaire à celle de la prohormone UII de carpe et à celle du précurseur UII de la grenouille. Tous ces précurseurs comprennent une séquence signal en N-terminal puis un peptide flanquant, un site de clivage protéolytique (Lys/Arg-Lys-Arg) et la séquence de l'urotensine II, localisée à l'extrémité C-terminale de chaque précurseur.

Les peptides flanquants N-terminaux des précurseurs de carpe, de grenouille et humain ne présentent quasiment pas de similarité.

L'UII humaine ne comprend que 11 acides aminés alors que l'UII de grenouille et de carpe en possèdent respectivement 13 et 12 (figure 6).

La séquence de l'heptapeptide cyclique C-terminal de l'urotensine II est conservée chez la grenouille et chez l'homme. Au contraire, la région N-terminale du peptide est très variable.

Chez la grenouille, comme chez la carpe, la région C-terminale du peptide flanquant contient un site de clivage potentiel dibasique (Arg-Lys et Arg-Arg) qui pourrait générer le dipeptide conservé Gln-Phe.

Cependant, chez l'homme, la séquence du dipeptide correspondant est totalement différente (Pro-Tyr) (figure 1 et figure 2).

* Distribution de l'ARNm de la prépro-UII humaine a été étudiée :

La distribution tissulaire de l'ARNm de la prépro-UII humain a été étudiée par analyse dot blot (figure 5A).

Sur les 50 tissus différents testés, la moelle épinière présente le signal d'hybridation le plus important. L'ARNm de la prépro-UII est également observé dans la *medulla oblongata* mais l'intensité du signal est bien plus faible que

celle obtenue dans la moelle épinière.

Dans les tissus périphériques, la présence d'ARNm de la prépro-UII est détectée dans le rein, la rate, l'intestin grêle, le thymus, la prostate, l'hypophyse, la glande surrénale et en moindres quantités, dans l'estomac, le pancréas, les ovaires et le
5 foie (figure 5A).

L'analyse par *Northern blot* révèle la présence d'une seule bande correspondant à un ARNm de la prépro-UII d'environ 700 pb, dans la moelle épinière humaine.

Le marquage de sections de la portion cervicale de la moelle épinière
10 humaine par hybridation *in situ* montre que l'ARNm de la prépro-UII est localisé dans les motoneurones (figure 5C).

* Caractérisation de l'ADNc de prépro-UII de rat et de souris :

Le cadre de lecture ouvert des ADNc du précurseur de l'UII de rat et de souris code pour une protéine de 123 acides aminés (figures 3 et 4).

15 La figure 7 illustre les résultats de la distribution dans divers tissus de rat et de souris par RT-PCR. Les ARN totaux sont extraits et soumis à une réaction de RT-PCR, dans des conditions similaires à celles exposées ci-dessus.

A la figure 7A, les produits PCR de rat (gauche) et de souris (droite) sont détectés par hybridation avec une sonde oligonucléotidique interne et spécifique
20 de rat et de souris (respectivement les séquences SEQ ID NO:43 et 44).

La figure 7B illustre le dépôt sur gel d'agarose des produits PCR GAPDH utilisés comme contrôle pour refléter des taux équivalents d'ARN.

RÉFÉRENCES

1. H.A. Bern et al., *Rec. Prog. Horm. Res.*, 1985, **41**, 533-552.
- 25 2. K. Lederis et al., *Science*, 1982, **218**, 162-164.
3. D. Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 5021-5024.
4. J.M. Conlon et al., *Regul. Pept.*, 1997, **69**, 95-103.
5. D. Waugh et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1993, **92**, 419-427.
6. Waugh et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1995, **99**, 323-332.
- 30 7. J.M. Conlon et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **188**, 578-583.

8. G.C. Gonzalez et al., *Peptides*, 1992, **13**, 695-703.
9. J. Vaughan et al., *Nature*, 1995, **378**, 287-292.
10. C.J. Donaldson et al., *Endocrinology*, 1996, **137**, 2167-2170.
11. H. Itoh et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, **149**, 61-66.
- 5 12. A. Gibson et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1986, **64**, 435-439.
13. I. Muramatsu et al., *Gunma Symp. Endocrinol.*, 1979, **16**, 39-47.
14. A. Gibson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 625-629.
15. P. Chomczynski et al., *Anal. Biochem.*, 1987, **162**, 156-159.
16. H. Tostivint et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 12605-12610.
- 10 17. S. Ohsako et al., *J. Neurosci.*, 1986, **6**, 2730-2735.
18. S. Kumar et al., *Nature*, 1998, **392**, 917-920.
19. J.M. Conlon et al., *FEBS Lett.*, 1990, **266**, 37-40.
20. T. Ichikawa et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1984, **55**, 133-141.
21. Y. Rouillé et al., *Front. Neuroendocrinol.*, 1995, **16**, 322-361.
- 15 22. C.D. Minth et al., *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 10372-10377.
23. J.M. Conlon et al., *J. Exp. Zool.*, 1996, **275**, 226-238.
24. L.P. Shen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 4575-4579.
25. L. de Lecea et al., *Genomics*, 1997, **42**, 499-506.
26. N. Chartrel et al., *J. Comp. Neurol.*, 1996, **364**, 324-339.
- 20 27. C.R. Yulis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 7079-7083.
28. C.R. Yullis et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1988, **70**, 301-311.
29. U. Arvidsson et al., *NeuroReport*, 1993, **4**, 849-856.
30. S.J. Gibson et al., *J. Neurosci.*, 1984, **4**, 3101-3111.
31. M. Matteoli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 7366-7370.
- 25 32. J.P. Changeux et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, **657**, 361-378.
33. C. Sala et al., *J. Neurosci.*, 1995, **15**, 520-528.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du

30 cadre ni de la portée de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°) Peptides, isolés de mammifères, caractérisés en ce qu'ils comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa (SEQ ID NO:9) dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine.

2°) Peptide de mammifère selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences humaines SEQ ID NO:1-3, par les séquences de rat SEQ ID: 30-32 et par les séquences de souris SEQ ID:33-35.

3°) Fragment d'acide nucléique purifié, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour un peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2 ou sa séquence complémentaire.

4°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:4-6, les séquences SEQ ID NO:18-20 et les séquences SEQ ID NO:27-29.

5°) Vecteur recombinant contenant un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

6°) Cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

7°) Réactif de détection d'un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend entre 20 et 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:4, de la séquence SEQ ID NO:18 ou de la séquence SEQ ID NO:27.

8°) Réactif selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, codant pour un dipeptide (Pro-Tyr), en amont du site de clivage tribasique,

lui-même situé juste en amont de la séquence codant pour l'urotensine II humaine et spécifique de ladite séquence humaine ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces : SEQ ID NO:7 et NO:8, SEQ ID NO:10-17 ; SEQ ID NO:21-26 ; SEQ ID NO:36-42, et

5 - des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:4 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:4 ; séquence SEQ ID NO :18 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:18 et séquence SEQ ID NO :27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:27.

10 9°) Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 ou une séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 3 et 4 codant pour tout ou partie desdits peptides, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

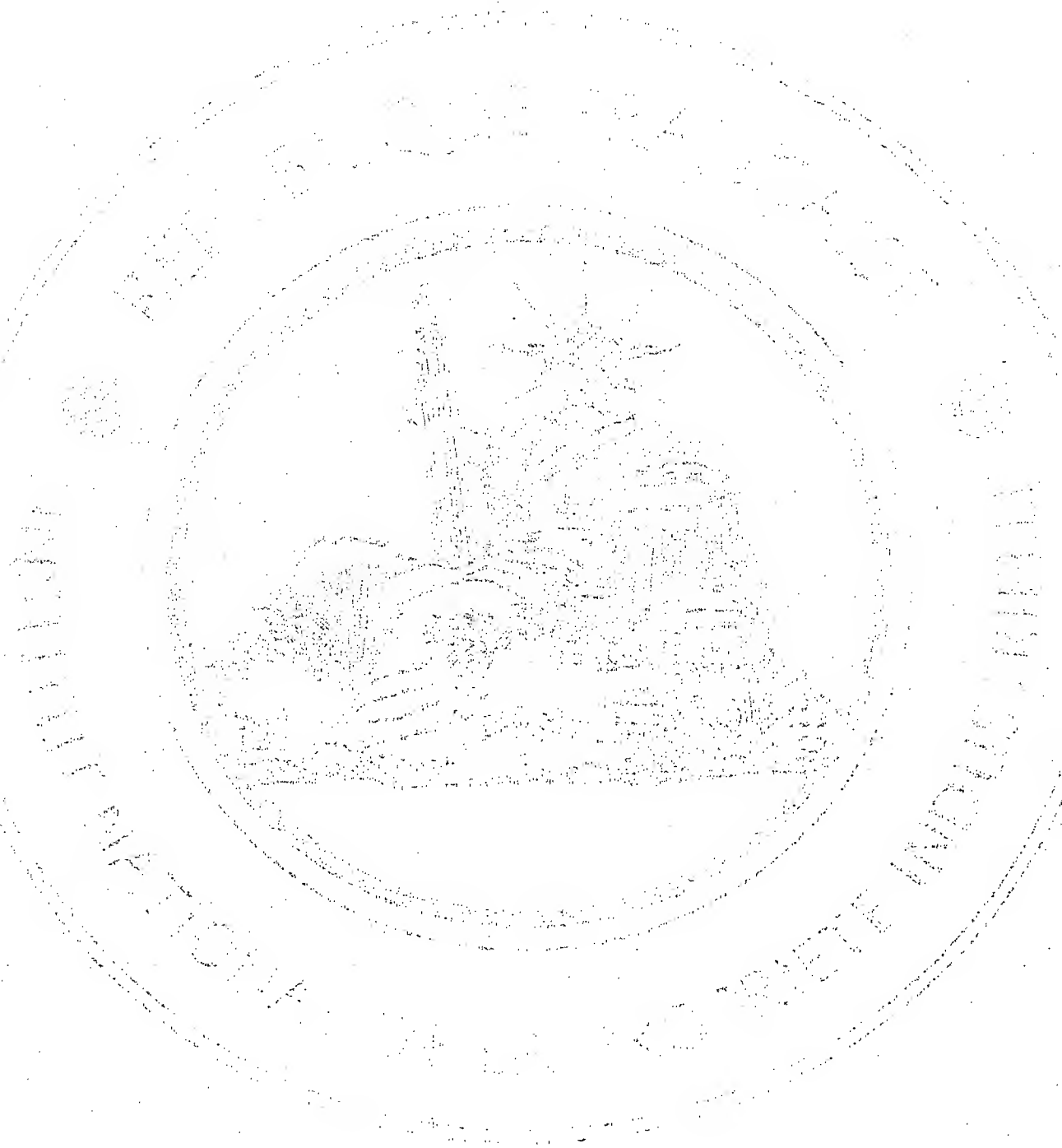
15 10°) Utilisation d'une pro-urotensine II ou d'une urotensine II pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière ou amyotrophies spinales, les traumatismes de la moelle épinière.

20 11°) Procédé de détection de la présence ou de l'absence d'un ARNm codant pour une urotensine II de mammifère, notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière par mise en contact d'un échantillon biologique, convenablement traité, avec au moins un réactif selon la revendication 7 ou la revendication 8.

25 12°) Procédé de détection d'une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine, caractérisé en ce qu'il comprend l'extraction dudit ADN ou dudit ARNm à partir d'un échantillon biologique et sa comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon la revendication 3 ou la revendication 4.

30 13°) Kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, apte à détecter la présence d'un ARNm, éventuellement modifié, codant pour une urotensine II de mammifère dans un échantillon biologique.

14°) Utilisation des peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour la sélection d'anti-hypertenseurs.



LISTAGE DE SEQUENCE

feuille avant rectification

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M

<120> UROTENSINE II DE MAMMIFERE ET SES APPLICATIONS.

<130> BLOcp598EXT25

<140>

<141>

<160> 44

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Lys Leu Ala Ser Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Phe Leu Asn
1 5 10 15Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser Phe Gln
20 25 30Leu Ser Ala Pro His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu Glu Leu Glu
35 40 45Arg Ala Ser Leu Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu Gly Ala Glu Arg
50 55 60Gly Asp Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr Asn Ile Phe Asn Pro
65 70 75 80Arg Gly Asn Leu Arg Lys Phe Gln Asp Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn
85 90 95Ile Leu Leu Ser His Leu Leu Ala Arg Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys
100 105 110Arg Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
115 120

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser Phe Gln Leu Ser Ala Pro
1 5 10 15His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu Glu Leu Glu Arg Ala Ser Leu
20 25 30Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu Gly Ala Glu Arg Gly Asp Ile Leu
35 40 45Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr Asn Ile Phe Asn Pro Arg Gly Asn Leu
50 55 60Arg Lys Phe Gln Asp Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Leu Leu Ser
65 70 75 80His Leu Leu Ala Arg Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Glu Thr Pro
85 90 95Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
100

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5 10

<210> 4
 <211> 551
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 ccaagaagga agccgtctat ctgtggcga tcatgtataa gctggcctcc tgctgtttgc 60
 ttttcatagg attcttaaat cctctcttat ctcttcctct ccttgactcc agggaaatat 120
 cctttcaact ctacagacct catgaagacg cgcgttaac tccggaggag ctagaaagag 180
 cttcccttct acagatactg ccagagatgc tgggtgcaga aagaggggat attctcagga 240
 aagcagactc aagtaccac atttttaacc caagaggaaa tttagaaaag tttcaggatt 300
 tctctggaca agatcctaac attttactga gtcattcttt ggccagaatc tggaaacat 360
 acaagaaacg tgagactcct gattgcttct ggaaatactg tgtctgaagt gaaataagca 420
 tctgttagtc agctcagaaa caccatctt agaatatgaa aaataacaca atgcttgatt 480
 tgaaaacagt gtggagaaaa actaggcaaa ctacaccctg ttcattgtta cctggaaaat 540
 aaatcctcta t 551

<210> 5
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 cttcctctcc ttgactccag ggaaatatcc tttcaactct cagcacctca tgaagacgcg 60
 cgcttaactc cggaggagct agaagagct tcccttctac agatactgcc agagatgctg 120
 ggtgcagaaa gaggggatat tctcaggaaa gcagactcaa gtaccaacat ttttaaccac 180
 agaggaaatt tgagaaagtt tcaggatttc tctggacaag atcctaacat tttactgagt 240
 catcttttgg ccagaatctg gaaaccatac aagaaactg agactcctga ttgcttctgg 300
 aaatactgtg tctga 315

<210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gagactcctg attgcttctg gaaatactgt gtctga 36

<210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 aacccaagag gaaatttgag aaagtt 26

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 ccaggtaaca atgaacagg tgtag 25

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 ctgccagaga tgctgggtg 19

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gacacagtat ttccagaagc aatc 24

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 cctcctgctg tttgcttttc 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 cccagcatct ctggcagtat 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gaagccgtct atcttgtggc 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 cgtctatctt gtggcgatca 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 cgtcttcatg aggtgctgag 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17
ggaagccgtc tatcttgtgg

20

<210> 18
<211> 529
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 18
cggagcagac acccagccag acttcttccc gtcgtcatgg acaggggtgcc cttctgctgc 60
ctgctcttcg taggactcct gaatccactc ctgtcttttc ccgtcacgga cactggtgaa 120
atgtctcttc agcttccagt gcttgaggaa aatgctcttc gggctctgga ggagctggag 180
aggactgccc tcctgcagac gctgcgccag accgtgggca cagaagcaga gggaagcctt 240
ggccaggcag atccagtgcc cgagactccc actccaaggg gaagcttgag gaaggctctc 300
actgggcaag attctaacac tgtactgagc cgtcttttgg cgagaaccag gaaacaacgt 360
aagcaacacg ggactgcccc agaatgcttc tggaagtact gcatttgaag agagacgtct 420
cctcagaacc atcacttcag gaaactaaag agcagatgct tgaagaaaaa tcgtgccaac 480
aacgccccgt tctccactat gagaataaaa ccctctatgt ttctcaact 529

<210> 19
<211> 312
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 19
tttcccgtca cggacactgg tgaaatgtct cttcagcttc cagtgttga ggaaaatgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggact gccctcctgc agacgtgag ccagaccgtg 120
ggcacagaag cagaggggag ccttggccag gcagatccca gtgccgagac tccactcca 180
aggggaagct tgaggaaggc tctcactggg caagattcta aactgtact gagccgtctt 240
ttggcgagaa ccaggaataa acgtaagcaa cacgggactg cccagaatg cttctggaag 300
tactgcattt ga 312

<210> 20
<211> 42
<212> ADN
<213> Rattus exulans

<400> 20
caacacggga ctgccccaga atgcttctgg aagtactgca tt 42

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 21
agcttccagt gcttgaggaa 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 22
gttagaattt tgcccagcga 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 23
gcttccagtg cttgaggaag 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 24
tctgctgcct gctcttcata 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 25
acggacactg gtgagaggac

20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 26
gagcgtcttc ctcaagcact

20

<210> 27
<211> 539
<212> ADN
<213> MUS

<400> 27
cgagagcaga cgcccagacg gactttctgc cgcattcatgg acaggggtgcc cttctgctgc 60
ctgctcttca taggacttct gaatccactg ctgtcccttc ccgtcacgga cactggtgag 120
aggactcttc agcttccagt gcttgaggaa gacgctcttc gggctctgga ggagctggag 180
aggatggccc tcctgcagac cctgcgtcag accatgggca cggaagcagg ggagagccct 240
ggagaagcag gtcccagcac tgagactccc actccacggg gaagcatgag gaaggctttc 300
gctgggcaaa attctaacac tgtactgagt cgtctcttgg caagaaccag gaaacaacat 360
aagcaacacg gggctgcccc agagtgtctc tggaaatact gcatttgagg agacacaagc 420
gcccggttgg ctctcagaac cattacattc aggaaacggg cagagcagat gcttgaagca 480
aaatcacgct aacgacgcct tgttcttcat tatgagaaat aaatcctcta tgtttctca 539

<210> 28
<211> 443
<212> ADN
<213> MUS

<400> 28
cttcccgtca cggacactgg tgagaggact cttcagcttc cagtgttga ggaagacgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggatg gccctcctgc agaccctgcg tcagaccatg 120
ggcacggaag caggggagag ccctggagaa gcaggtccca gactgagac tcccactcca 180
cggggaagca tgaggaaggc ttctgctggg caaaattcta aactgtact gactcgtctc 240
ttggcaagaa ccaggaaaca acataagcaa cacggggctg ccccagagt cttctggaaa 300
tactgcattt gaggagacac aagcggccgt tggctctca gaaccattac attcaggaaa 360
cgggcagagc agatgcttga agcaaaatca cgtaacgac gcctgttct tcattatgag 420
aaataaatcc tctatgtttc tca 443

<210> 29
<211> 309
<212> ADN
<213> MUS

<400> 29
cttcccgtca cggacactgg tgagaggact cttcagcttc cagtgttga ggaagacgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggatg gccctcctgc agaccctgcg tcagaccatg 120
ggcacggaag caggggagag ccctggagaa gcaggtccca gactgagac tcccactcca 180
cggggaagca tgaggaaggc ttctgctggg caaaattcta aactgtact gactcgtctc 240
ttggcaagaa ccaggaaaca acataagcaa cacggggctg ccccagagt cttctggaaa 300
tactgcatt 309

<210> 30
<211> 123
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 30
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln
20 25 30

feuille avant rectification

Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala L u Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala
50 55 60

Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro
65 70 75 80

Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val
85 90 95

Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly
100 105 110

Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
115 120

<210> 31
<211> 103
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 31
Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln Leu Pro Val Leu
1 5 10 15

Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Thr Ala Leu
20 25 30

Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala Glu Gly Ser Leu
35 40 45

Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Leu
50 55 60

Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
65 70 75 80

Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu
85 90 95

Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
100

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 32
Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
1 5 10

<210> 33
<211> 123
<212> PRT
<213> MUS

<400> 33
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln
20 25 30

Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met Gly Thr Glu Ala
 50 55 60
 Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val
 85 90 95
 Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly
 100 105 110
 Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 115 120

<210> 34
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> MUS

<400> 34
 Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln Leu Pro Val Leu
 1 5 10 15
 Glu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu
 20 25 30
 Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro
 35 40 45
 Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Met
 50 55 60
 Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu
 85 90 95
 Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 100

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> MUS

<400> 35
 Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys
 1 5 10 15

Ile

<210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 36
 gctctcactg ggcaagattc

20

<210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 37
 tctcatagtg gagaacgggg

20

feuille avant rectification

<210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 38
 ggaagcttga ggaaggctct

20

<210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 39
 agcttccagt gcttgaggaa

20

<210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 40
 gaatcttgcc cagtgaagagc

20

<210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 41
 gtactgagcc gtcttttggc

20

<210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus exulans

<400> 42
 tgcctgctct tcgtaggact

20

<210> 43
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 43
 gtgccacagg tctggcgcag cgtctgcagg

30

<210> 44
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> MUS

<400> 44
 tcccctgctt ccgtgcccat ggtctgacgc

30

. les séquences SEQ ID NO:24 (positions 131-150 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

. les séquences SEQ ID NO:25 (positions 295-314 de la séquence SEQ ID NO:27) et SEQ ID NO:22 ;

5 . les séquences SEQ ID NO:24 et SEQ ID NO:26 (positions 322-341 de la séquence SEQ ID NO:27).

- des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:27 et notamment la séquence SEQ ID NO :44 (positions 204-233 de la séquence SEQ ID
10 NO:27).

Les conditions d'hybridation des sondes murines sont similaires à celles exposées ci-dessus, pour les séquences humaines.

Compte tenu des données à la disposition des Inventeurs, il n'était pas évident que les mammifères puissent exprimer une urotensine II et que cette
15 dernière exerçât effectivement d'autres effets que des effets cardiovasculaires.

Lesdits polypeptides et peptides peuvent être produits, soit en exprimant les séquences d'acides nucléiques telles que définies ci-dessus dans des cellules hôtes, soit par synthèse, et notamment par synthèse selon la technique de Merrifield.

20 Les séquences nucléiques ci-dessus définies ont comme première application de détecter soit la présence ou l'absence de l'ARNm codant pour une urotensine II de mammifère et notamment pour l'urotensine II humaine dans des échantillons biologiques (biopsies, par exemple), notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière, soit de détecter
25 une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine (comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon l'invention).

Les séquences nucléiques ci-dessus définies ont comme deuxième application, la production de vecteurs aptes à exprimer les précurseurs de l'urotensine II humaine, notamment dans le cadre d'une thérapie génique ciblée.

30 La présente invention a également pour objet une cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un peptide tel

REVENDEICATIONS

1°) Peptides, isolés de mammifères, caractérisés en ce qu'ils comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa (SEQ ID NO:9) dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine.

2°) Peptide de mammifère selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences humaines SEQ ID NO :1-3, par les séquences de rat SEQ ID: 30-32 et par les séquences de souris SEQ ID :33-35.

3°) Fragment d'acide nucléique purifié, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour un peptide selon la revendication 1 ou la revendication 2 ou sa séquence complémentaire.

4°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:4-6, les séquences SEQ ID NO:18-20 et les séquences SEQ ID NO:27-29.

5°) Vecteur recombinant contenant un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

6°) Cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

7°) Réactif de détection d'un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend entre 20 et 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:4, de la séquence SEQ ID NO:18 ou de la séquence SEQ ID NO:27.

8°) Réactif selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, codant pour un dipeptide (Pro-Tyr), en amont du site de clivage tribasique,

lui-même situé juste en amont de la séquence codant pour l'urotensine II humaine et spécifique de ladite séquence humaine ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces : SEQ ID NO:7 et NO:8, SEQ ID NO:10-17 ; SEQ ID NO:21-26 ; SEQ ID NO:36-42, et

5 - des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:4 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:4 ; séquence SEQ ID NO :18 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:18 et séquence SEQ ID NO :27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:27.

10 9°) Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 ou une séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 3 et 4 codant pour tout ou partie desdits peptides, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 10°) Utilisation d'une pro-urotensine II ou d'une urotensine II pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière ou amyotrophies spinales, les traumatismes de la moelle épinière.

20 11°) Procédé de détection de la présence ou de l'absence d'un ARNm codant pour une urotensine II de mammifère, notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière par mise en contact d'un échantillon biologique, convenablement traité, avec au moins un réactif selon la revendication 7 ou la revendication 8.

25 12°) Procédé de détection d'une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine, caractérisé en ce qu'il comprend l'extraction dudit ADN ou dudit ARNm à partir d'un échantillon biologique et sa comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon la revendication 3 ou la revendication 4.

30 13°) Kit de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, apte à détecter la présence d'un ARNm, éventuellement modifié, codant pour une urotensine II de mammifère dans un échantillon biologique.

14°) Utilisation des peptides tels que définis à la revendication 1 ou la revendication 2, pour la sélection d'anti-hypertenseurs.



LISTAGE DE SEQUENCE

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M

<120> UROTENSINE II DE MAMMIFERE ET SES APPLICATIONS.

<130> BLOcp598EXT25

<140>

<141>

<160> 44

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Lys Leu Ala Ser Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Phe Leu Asn
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser Phe Gln
 20 25 30

Leu Ser Ala Pro His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu Glu Leu Glu
 35 40 45

Arg Ala Ser Leu Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu Gly Ala Glu Arg
 50 55 60

Gly Asp Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr Asn Ile Phe Asn Pro
 65 70 75 80

Arg Gly Asn Leu Arg Lys Phe Gln Asp Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn
 85 90 95

Ile Leu Leu Ser His Leu Leu Ala Arg Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys
 100 105 110

Arg Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 115 120

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser Phe Gln Leu Ser Ala Pro
 1 5 10 15

His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu Glu Leu Glu Arg Ala Ser Leu
 20 25 30

Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu Gly Ala Glu Arg Gly Asp Ile Leu
 35 40 45

Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr Asn Ile Phe Asn Pro Arg Gly Asn Leu
 50 55 60

Arg Lys Phe Gln Asp Phe Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Leu Leu Ser
 65 70 75 80

His Leu Leu Ala Arg Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Glu Thr Pro
 85 90 95

Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 100

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5 10

<210> 4
 <211> 551
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 ccaagaagga agccgtctat cttgtggcga tcatgtataa gctggcctcc tgctgtttgc 60
 ttttcatagg attcttaaat cctctcttat ctcttctct ccttgactcc agggaaatat 120
 cctttcaact ctcagcacct catgaagacg cgcgcttaac tccggaggag ctgaaagag 180
 cttcccttct acagatactg ccagagatgc tgggtgcaga aagaggggat attctcagga 240
 aagcagactc aagtaaccaac atttttaacc caagaggaaa ttgagaaag tticaggatt 300
 tctctggaca agatcctaac attttactga gtcattcttt ggccagaatc tggaaacat 360
 acaagaaacg tgagactcct gattgcttct ggaaatactg tgtctgaagt gaaataagca 420
 tctgttagtc agtcagaaa caccatctt agaatatgaa aaataacaca atgcttgatt 480
 tgaaaacagt gtggagaaaa actaggcaaa ctacaccctg ttcattgtta cctggaaaat 540
 aaatcctcta t 551

<210> 5
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 cttcctctcc ttgactccag ggaaatatcc tttcaactct cagcacctca tgaagacgcg 60
 cgcttaactc cggaggagct agaaagagct tcccttctac agatactgcc agagatgctg 120
 ggtgcagaaa gaggggatat ttcaggaaa gcagactcaa gtaccaacat ttttaacca 180
 agaggaaatt tgagaaagtt tcaggatttc tctggacaag atcctaakat tttactgagt 240
 catcttttgg ccagaatctg gaaaccatac aagaaacgtg agactcctga ttgcttctg 300
 aaatactgtg tctga 315

<210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gagactcctg attgcttctg gaaatactgt gtctga 36

<210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 aaccaagag gaaatttgag aaagtt 26

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 ccaggttaaca atgaacaggg tgtag 25

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Val
 1 5

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 ctgccagaga tgctgggtg 19

<210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gacacagtat ttccagaagc aatc 24

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 cctcctgctg tttgcttttc 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 cccagcatct ctggcagtat 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gaagccgtct atcttggtggc 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 cgtctatctt gtggcgatca 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 cgtcttcatg aggtgctgag 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 17
ggaagccgtc tatcttgtgg

20

<210> 18
<211> 529
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 18
cggagcagac acccagccag acttcttccc gtcgtcatgg acagggtgcc cttctgctgc 60
ctgctcttcg taggactcct gaatccactc ctgtcttttc ccgtcacgga cactggtgaa 120
atgtctcttc agcttccagt gcttgaggaa aatgctcttc gggctctgga ggagctggag 180
aggactgccc tcctgcagac gctgcgccag accgtgggca cagaagcaga gggaagcctt 240
ggccaggcag atcccagtg cagactccc actccaaggg gaagcttgag gaaggctctc 300
actgggcaag attctaacac tgtactgagc cgtcttttgg cgagaaccag gaaacaacgt 360
aagcaacacg ggactgcccc agaattgctt tggaagtact gcatttgaag agagacgtct 420
cctcagaacc atcacttcag gaaactaaag agcagatgct tgaagaaaaa tcgtgccaac 480
aacgccccgt tctccactat gagaaataaa ccctctatgt ttctcaact 529

<210> 19
<211> 312
<212> ADN
<213> Rattus sp.

<400> 19
tttcccgtca cggacactgg tgaaatgtct cttcagcttc cagtgttga ggaaaatgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggact gccctcctgc agacgtgctg ccagaccgtg 120
ggcacagaag cagagggaag ccttggccag gcagatccca gtgccgagac tcccactcca 180
aggggaagct tgaggaaggc tctactggg caagattcta aactgtact gagccgtctt 240
ttggcgagaa ccaggaaaca acgtaagcaa cacgggactg cccagaatg cttctggaag 300
tactgcattt ga 312

<210> 20
<211> 42
<212> ADN
<213> Rattus exulans

<400> 20
caacacggga ctgccccaga atgcttctgg aagtactgca tt 42

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 21
agcttccagt gcttgaggaa 20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 22
gttagaattt tgcccagcga 20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 23
gcttccagt cttgaggaag 20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 24
tctgtgcct gctcttcata 20

1000116 recd 1/16

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 25
acggacactg gtgagaggac

20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> MUS

<400> 26
gagcgtcttc ctcaagcact

20

<210> 27
<211> 539
<212> ADN
<213> MUS

<400> 27
cgagagcaga cgcccagacg gacttctcgc cgcacatcgg acaggggtgcc cttctgtctgc 60
ctgctcttca taggacttct gaatccactg ctgtcccttc ccgtcacgga cactgggtgag 120
aggactcttc agcttccagt gcttgaggaa gacgctcttc gggctctgga ggagctggag 180
aggatggccc tcctgcagac cctgcgtcag accatgggca cggaagcagg ggagagccct 240
ggagaagcag gtcccagcac tgagactccc actccacggg gaagcatgag gaaggctttc 300
gctgggcaaaa attctaacac tgtactgagt cgtctcttgg caagaaccag gaaacaacat 360
aagcaacacg gggctgcccc agagtgtctc tggaaatact gcatttgagg agacacaagc 420
gcccgttggg ctctcagaac cattacattc aggaaacggg cagagcagat gcttgaagca 480
aaatcacgct aacgacgcct tgttcttcat tatgagaaat aaatcctcta tgtttctca 539

<210> 28
<211> 443
<212> ADN
<213> MUS

<400> 28
cttcccgtca cggacactgg tgagaggact cttcagcttc cagtgttga ggaagacgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggatg gccctcctgc agaccctgcg tcagaccatg 120
ggcacggaag caggggagag ccctggagaa gcagggtccca gcactgagac tcccactcca 180
cggggaagca tgaggaaggc ttctcgtggg caaaaattcta acactgtact gagtctgtc 240
ttggcaagaa ccaggaaaca acataagcaa cacggggctg ccccagagtg cttctggaaa 300
tactgcattt gaggagacac aagcgcccgt tggctcttca gaaccattac attcaggaaa 360
cgggcagagc agatgcttga agcaaaatca cgtaacgac gccttgttct tcattatgag 420
aaataaatcc tctatgtttc tca 443

<210> 29
<211> 309
<212> ADN
<213> MUS

<400> 29
cttcccgtca cggacactgg tgagaggact cttcagcttc cagtgttga ggaagacgct 60
cttcgggctc tggaggagct ggagaggatg gccctcctgc agaccctgcg tcagaccatg 120
ggcacggaag caggggagag ccctggagaa gcagggtccca gcactgagac tcccactcca 180
cggggaagca tgaggaaggc ttctcgtggg caaaaattcta acactgtact gagtctgtc 240
ttggcaagaa ccaggaaaca acataagcaa cacggggctg ccccagagtg cttctggaaa 300
tactgcatt 309

<210> 30
<211> 123
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 30
Met Asp Arg Val Pro Ph Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln
20 25 30

Small rectified

Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala
50 55 60

Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro
65 70 75 80

Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val
85 90 95

Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly
100 105 110

Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
115 120

<210> 31
<211> 103
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 31
Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln Leu Pro Val Leu
1 5 10 15

Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Thr Ala Leu
20 25 30

Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala Glu Gly Ser Leu
35 40 45

Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Leu
50 55 60

Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
65 70 75 80

Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu
85 90 95

Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
100

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 32
Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
1 5 10

<210> 33
<211> 123
<212> PRT
<213> MUS

<400> 33
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn
1 5 10 15

Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln
20 25 30

Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu
35 40 45

Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met Gly Thr Glu Ala
 50 55 60

Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro
 65 70 75 80

Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val
 85 90 95

Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly
 100 105 110

Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 115 120

<210> 34
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> MUS

<400> 34
 Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln Leu Pro Val Leu
 1 5 10 15

Glu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu
 20 25 30

Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro
 35 40 45

Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Met
 50 55 60

Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu
 85 90 95

Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile
 100

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> MUS

<400> 35
 Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys
 1 5 10 15

Ile

<210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 36
 gctctcactg ggcaagattc

20

<210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 37
 tctcatagtg gagaacgggg

20

<210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 38
 ggaagcttga ggaaggctct 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 39
 agcttccagt gcttgaggaa 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 40
 gaatcttgcc cagtgcagac 20

<210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 41
 gtactgcagcc gctctttggc 20

<210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Rattus exulans

<400> 42
 tgcctgctct tcgtaggact 20

<210> 43
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Rattus sp.

<400> 43
 gtgccacagg tctggcgcag cgtctgcagg 30

<210> 44
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> MUS

<400> 44
 tccctgctt ccgtgccat ggtctgcgc 30

A	S	L	L	Q	I	L	P	E	M	L	G	-	-	A	E	R	G	-	-	D	I	L	R	K	A	D	S	S	T	N	I	F	N	P	R	G	N	L	R	K	F	Q	D	F	S	G	Q	D	P	
T	R	L	L	R	N	L	P	M	F	V	D	K	E	A	E	D	I	F	S	K	E	N	I	K	V	P	G	G	I	P	K	E	A	L	R	E	L	L	E	K	P	P	R	-	-	-	-			
A	V	S	D	L	N	D	L	Q	R	A	A	V	V	E	Y	S	-	-	P	L	L	S	R	E	N	I	K	V	P	G	G	I	P	K	E	A	L	R	E	L	L	E	K	P	P	-	-	-	-	
S	V	S	D	L	N	E	H	L	Q	R	A	A	V	A	G	Y	S	-	-	P	L	F	S	Q	E	N	I	K	V	P	G	G	I	P	K	E	A	L	R	E	L	L	E	K	P	P	-	-	-	-

Humanin	N	I	L	L	S	H	L	L	A	R	I	W	K	P	Y	K	K	R	E	T	-	P	D	C	F	W	K	Y	C	V	124		
Grenouille	I	S	L	L	B	R	L	Q	S	K	D	R	K	Q	F	F	K	K	R	A	G	N	L	S	E	C	F	W	K	Y	C	V	127
Carpe α	R	L	I	P	P	S	G	L	W	G	S	R	R	Q	Q	F	R	K	R	G	G	-	G	A	D	C	F	W	K	Y	C	V	125
Carpe γ	R	L	I	P	P	R	G	L	W	G	S	R	R	Q	Q	F	R	K	R	G	G	-	G	A	D	C	F	W	K	Y	C	I	126

FIGURE 1

CCAAGAAGGAAGCCGTCTATCTTGTGGCGATC

ATG TAT AAG CTG GCC TCC TGC TGT TTG CTT TTC ATA GGA TTC TTA
Met Tyr Lys Leu Ala Ser Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Phe Leu

PEPTIDE SIGNAL

AAT CCT CTC TTA TCT CTT CCT CTC CTT GAC TCC AGG GAA ATA TCC
Asn Pro Leu Leu Ser Leu Pro Leu Leu Asp Ser Arg Glu Ile Ser

TTT CAA CTC TCA GCA CCT CAT GAA GAC GCG CGC TTA ACT CCG GAG
Phe Gln Leu Ser Ala Pro His Glu Asp Ala Arg Leu Thr Pro Glu

PRO-SEGMENT

GAG CTA GAA AGA GCT TCC CTT CTA CAG ATA CTG CCA GAG ATG CTG
Glu Leu Glu Arg Ala Ser Leu Leu Gln Ile Leu Pro Glu Met Leu

GGT GCA GAA AGA GGG GAT ATT CTC AGG AAA GCA GAC TCA AGT ACC
Gly Ala Glu Arg Gly Asp Ile Leu Arg Lys Ala Asp Ser Ser Thr

AAC ATT TTT AAC CCA AGA GGA AAT TTG AGA AAG TTT CAG GAT TTC
Asn Ile Phe Asn Pro Arg Gly Asn Leu Arg Lys Phe Gln Asp Phe

TCT GGA CAA GAT CCT AAC ATT TTA CTG AGT CAT CTT TTG GCC AGA
Ser Gly Gln Asp Pro Asn Ile Leu Leu Ser His Leu Leu Ala Arg

ATC TGG AAA CCA TAC AAG AAA CGT GAG ACT CCT GAT TGC TTC TGG
Ile Trp Lys Pro Tyr Lys Lys Arg Glu Thr Pro Asp Cys Phe Trp

UROTENSINE II

AAA TAC TGT GTC TGA
Lys Tyr Cys Val ***

AGTGAAATAAGCATCTGTTAGTCAGCTCAGAAACACCCATCTTAGAATATGAAAAATAACACA
ATGCTTGATTTGAAAACAGTGTGGAGAAAACTAGGCAAACCTACACCCTGTTCATTGTTACCT
GGAAATAAATCCTCTAT

5' CGG AGC AGA CAC CCA GCC AGA CTT CTT CCC GTC GTC ATG GAC AGG GTG CCC TTC
Met Asp Arg Val Pro Phe
.....

TGC TGC CTG CTC TTC GTA GGA CTC CTG AAT CCA CTC CTG TCT TTT CCC GTC ACG
Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr
.....

peptide signal

GAC ACT GGT GAA ATG TCT CTT CAG CTT CCA GTG CTT GAG GAA AAT GCT CTT CGG
Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg
.....

GCT CTG GAG GAG CTG GAG AGG ACT GCC CTC CTG CAG ACG CTG CGC CAG ACC GTG
Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val
.....

pro-segment

GGC ACA GAA GCA GAG GGA AGC CTT GGC CAG GCA GAT CCC AGT GCC GAG ACT CCC
Gly Thr Glu Ala Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro
.....

ACT CCA AGG GGA AGC TTG AGG AAG GCT CTC ACT GGG CAA GAT TCT AAC ACT GTA
Thr Pro Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val
.....

CTG AGC CGT CTT TTG GCG AGA ACC AGG AAA CAA CGT AAG CAA CAC GGG ACT GCC
Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala
.....

CCA GAA TGC TTC TGG AAG TAC TGC ATT TCA AGA GAG ACG TCT CCT CAG AAC CAT
Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile ***
.....

UrotensineII

CAC TTC AGG AAA CTA AAG AGC AGA TGC TTG AAG AAA AAT CGT GCC AAC AAC GCC
.....

CCG TTC TCC ACT ATG AGA AAT AAA CCC TCT ATG TTT CTC AAC T 3'

FIGURE 3

4/8

5' CCA GAG CAG ACG CCC AGA CGG ACT TCT CGC CGC ATC ATG GAC AGG GTG CCC TTC
Met Asp Arg Val Pro Phe

63 72 81 90 99 108
TGC TGC CTG CTC TTC ATA GGA CTT CTG AAT CCA CTG CTG TCC CTT CCC GTC ACG
Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr

peptide signal

117 126 135 144 153 162
GAC ACT GGT GAG AGG ACT CTT CAG CTT CCA GTG CTT GAG GAA GAC GCT CTT CGG
Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala Leu Arg

171 180 189 198 207 216
GCT CTG GAG GAG CTG GAG AGG ATG GCC CTC CTG CAG ACC CTG CGT CAG ACC ATG
Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met

pro-segment

225 234 243 252 261 270
GGC ACG GAA GCA GGG GAG AGC CCT GGA GAA GCA GGT CCC AGC ACT GAG ACT CCC
Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Glu Thr Pro

279 288 297 306 315 324
ACT CCA CGG GGA AGC ATG AGG AAG GCT TTC GCT GGG CAA AAT TCT AAC ACT GTA
Thr Pro Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val

333 342 351 360 369 378
CTG AGT CGT CTC TTG GCA AGA ACC AGG AAA CAA CAT AAG CAA CAC GGG GCT GCC
Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala

387 396 405 414 423 432
CCA GAG TGC TTC TGG AAA TAC TGC ATT TGA GGA GAC ACA AGC GCC CGT TGG TCT
Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile ***

Urotensine II

441 450 459 468 477 486
CTC AGA ACC ATT ACA TTC AGG AAA CGG GCA GAG CAG ATG CTT GAA GCA AAA TCA

495 504 513 522 531
CGC TAA CGA CGC CTT GTT CTT CAT TAT GAG AAA TAA ATC CTC TAT GTT TCT CA 3'

FIGURE 4

A

1 2 3 4 5 6 7 8

A

B

C

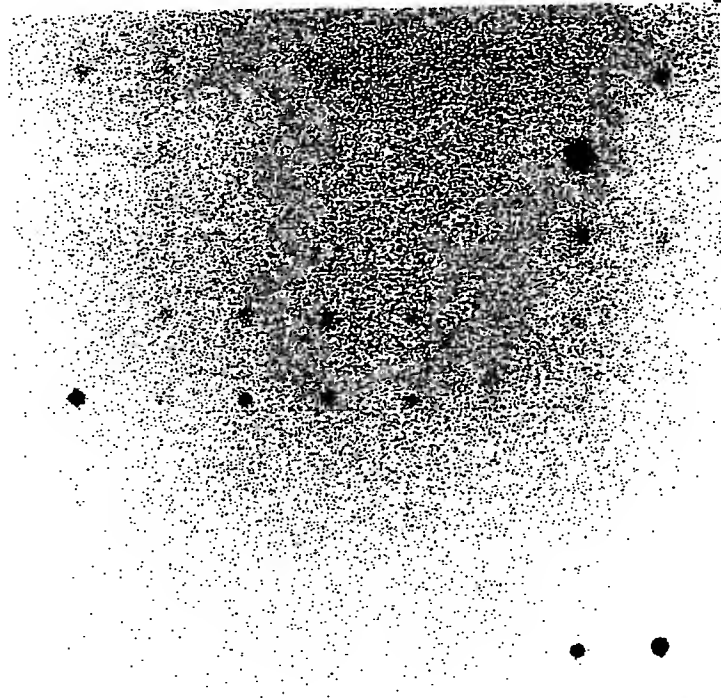
D

E

F

G

H



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	cerveau entier	amygdale	noyau caudé	cervelet	cortex cérébral	lobe frontal	hippocampe	<i>medulla oblongata</i>
B	lobe occipital	putamen	<i>locus niger</i>	lobe temporal	thalamus	noyau sous-thalamique	moelle épinière	-
C	cœur	aorte	muscle squelettique	colon	vessie	utérus	prostate	estomac
D	testicules	ovaires	pancréas	hypo-physe	glande surrénale	thyroïde	glande salivaire	glande mammaire
E	rein	foie	intestin grêle	rate	thymus	leucocyte périphérique	ganglion lymphatique	moelle osseuse
F	appendice	poumon	trachée	placenta	-	-	-	-
G	cerveau foetal	cœur foetal	rein foetal	foie foetal	rate foetale	thymus foetal	poumon foetal	-
H	ARN total de levure 100 ng	ARNt de levure 100 ng	ARNr d' <i>E. coli</i> 100 ng	ADN d' <i>E. coli</i> 100 ng	poly r(A) 100 ng	ADN C ₆ t1 humain	ADN humain 100 ng	ADN humain 500 ng

FIGURE 5.1

B

moelle
épineière

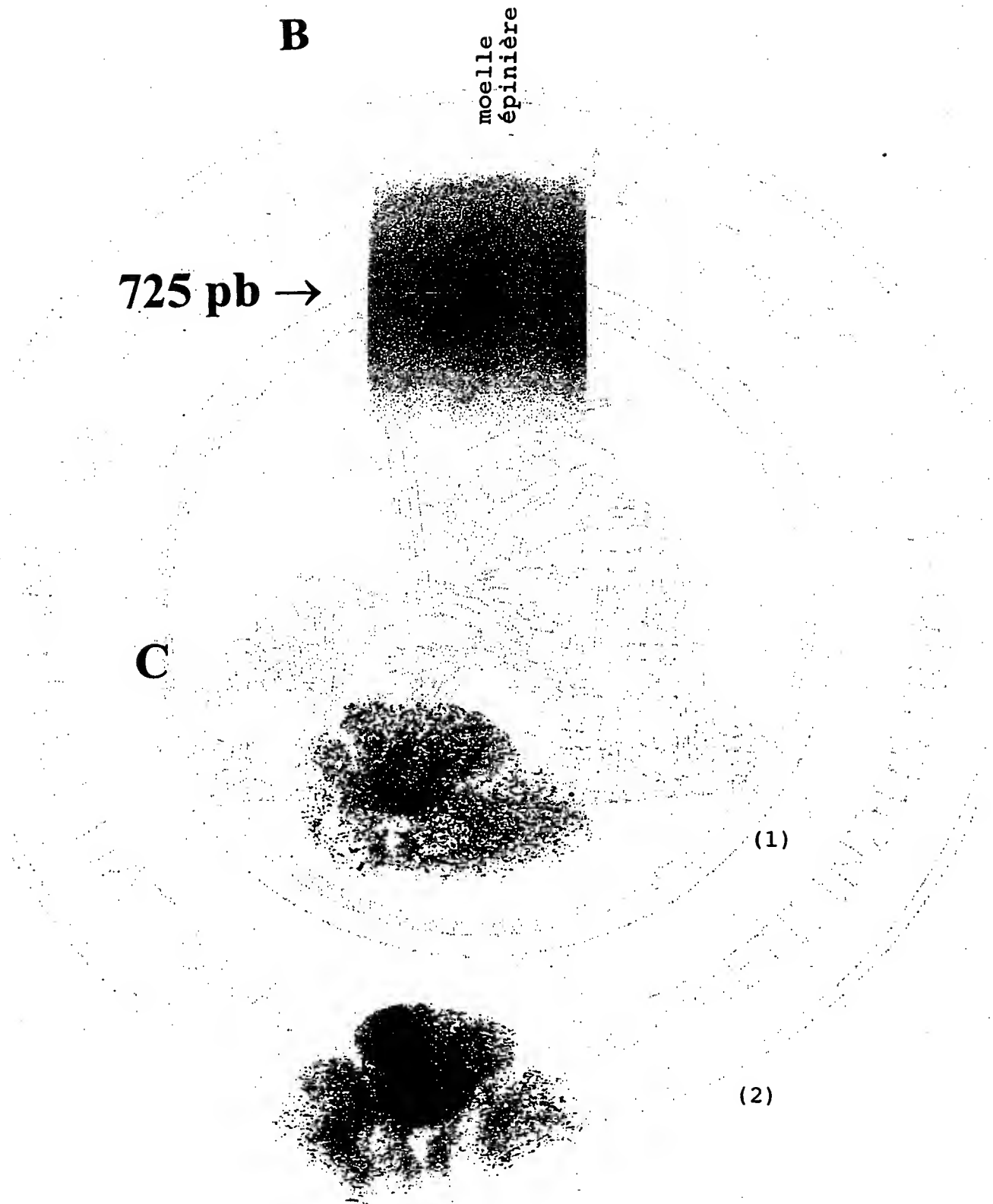
725 pb →

C

(1)

(2)

FIGURE 5.2



Humain	E	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Grenouille	A	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Goujon	A	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Truite	A	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Poisson ventouse A	G	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Poisson ventouse B	G	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Carpe α	G	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Carpe $\beta 1$	G	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Carpe $\beta 2$	G	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Carpe γ	G	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Flet	A	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Esturgeon	A	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Poisson spatule	-	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Raie	-	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Roussette	-	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V
Lamproie	-	-	G	G	S	S	G	G	S	G	G	G	A	-	-	N	N	N	N	C	Y	K	W	F	C	D	-	S	P	T	-	G	G	A	A	G	G	V

FIGURE 6

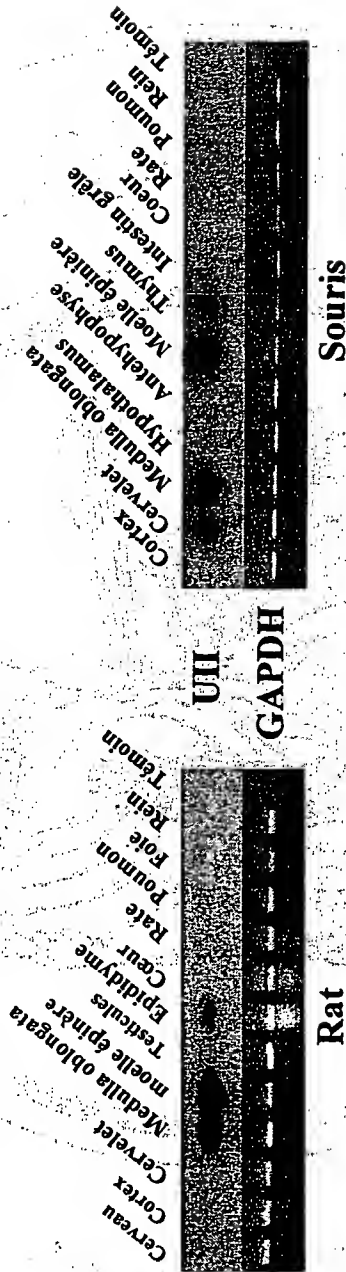


FIGURE 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REC'D 08 FEB 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp598/25P	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02941	Date du dépôt international (jour/mois/année) 26/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 26/11/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/16		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA... et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 3 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale

16/06/2000

Date d'achèvement du présent rapport

08.02.01

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d

Fonctionnaire autorisé

Chavanne, F



THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02941

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-12	version initiale	
13	reçue(s) avec télécopie du	23/01/2001

Revendications, N°:

1-14	reçue(s) avec télécopie du	23/01/2001
------	----------------------------	------------

Dessins, feuilles:

1/8-8/8	version initiale
---------	------------------

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-10, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02941

- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n^{os} :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1, 2, 4, 7-14
	Non : Revendications 3, 5, 6
Activité inventive	Oui : Revendications 1, 2, 4, 7-14
	Non : Revendications 3, 5, 6
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-14
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VI. Certain documents cités

1. Certains documents publiés (règle 70.10)
et / ou

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02941

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence au document suivant:

D1: Database EMBL ID AF172174

Numéro d'Accession Z98884

2. D1 décrit la séquence d'un fragment d'ADN génomique. Cette séquence comprend une séquence codante montrant une identité de 99% avec la séquence de l'ADNc de SEQ ID NO:4. La séquence de SEQ ID NO:4 comprend les séquences codant pour les polypeptides de SEQ ID NO:1-3.
- Par conséquent, au vu de D1, l'objet de la revendication 3 n'est pas nouvelle. De plus, il est à noter que, de part la formulation de la revendication 3, indépendamment du document D1, cette revendication ne peut être reconnue comme nouvelle. En effet, la revendication 3 se réfère à des oligonucléotides issus d'une séquence spécifique. La revendication 3 ne définit pas, notamment, la longueur des oligonucléotides revendiqués. En absence d'une telle indication, ces oligonucléotides peuvent donc être notamment constitués de quelques nucléotides seulement. De tels oligonucléotides sont trop courts pour être spécifiques d'une séquence donnée. Par conséquent, les fragments de la revendication 3 incluent des oligonucléotides non spécifiques d'une séquence donnée, certains étant connus dans l'état de la technique. La revendication 3 précise que les oligonucléotides constituent des sondes ou amorces. Ceci ne correspond à aucune caractéristique technique permettant de caractériser ces oligonucléotides, notamment leur longueur ou leur spécificité pour une séquence précise, et de ce fait ne permet pas de restaurer leur nouveauté. Par exemple, les hexanucléotides ne sont pas spécifiques pour une séquence donnée, sont connus dans l'état de la technique et peuvent servir de sonde ou d'amorce. Des vecteurs contenant ces oligonucléotides connus, ainsi que des cellules transformées par de tels vecteurs sont connus dans l'état de la technique.
- Les revendications 3, 5 et 6 ne remplissent donc pas les conditions de l'Article 33(2) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. Certains documents cités

Certains documents publiés (règle 70.10)

1. WO 99/35266
2. WO 00/00610

VIII. Observations relatives à la demande internationale

1. La référence à des sujets introduite par l'expression "notamment" (revendication 11) est donnée à titre d'exemple indicatif et en aucun cas exhaustif, et ne peut être considérée comme limitant l'objet de la revendication concernée.
2. La revendication 6 manque de clarté de part la formulation "cellules transformées par au moins un fragment d'acide nucléique". En effet, les cellules sont normalement transformées par un vecteur comprenant un ou des fragments précis, et non pas par des fragments d'acide nucléique (Art. 6 PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

L'analyse par *Northern blot* révèle la présence d'une seule bande correspondant à un ARNm de la prépro-UII d'environ 700 pb, dans la moelle épinière humaine.

Le marquage de sections de la portion cervicale de la moelle épinière humaine par hybridation *in situ* montre que l'ARNm de la prépro-UII est localisé dans les motoneurones (figure 5C).

* Caractérisation de l'ADNc de prépro-UII de rat et de souris :

Le cadre de lecture ouvert des ADNc du précurseur de l'UII de rat et de souris code pour une protéine de 123 acides aminés (figures 3 et 4).

La figure 7 illustre les résultats de la distribution dans divers tissus de rat et de souris par RT-PCR. Les ARN totaux sont extraits et soumis à une réaction de RT-PCR, dans des conditions similaires à celles exposées ci-dessus.

Dans la partie supérieure de la figure 7 (UII), les produits PCR de rat (gauche) et de souris (droite) sont détectés par hybridation avec une sonde oligonucléotidique interne et spécifique de rat et de souris (respectivement les séquences SEQ ID NO:43 et 44).

La partie inférieure de la figure 7 (GADPH) illustre le dépôt sur gel d'agarose des produits PCR GAPDH utilisés comme contrôle pour refléter des taux équivalents d'ARN.

20 RÉFÉRENCES

1. H.A. Bern et al., *Rec. Prog. Horm. Res.*, 1985, **41**, 533-552.
2. D. Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**, 5021-5024.
3. J.M. Conlon et al., *Regul. Pept.*, 1997, **69**, 95-103.
4. D. Waugh et J.M. Conlon, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1993, **92**, 419-427.
- 25 5. D. Waugh et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1995, **99**, 323-332.
6. J.M. Conlon et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **188**, 578-583.
7. G.C. Gonzalez et al., *Peptides*, 1992, **13**, 695-703.
8. H. Itoh et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, **149**, 61-66.
9. A. Gibson et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1986, **64**, 435-439.
- 30 10. I. Muramatsu et al., *Gunma Symp. Endocrinol.*, 1979, **16**, 39-47.
11. K. Yano et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1994, **96**, 412-419.
12. K. Yano et al., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1996, **97**, 103-110.
13. S. Ohsako et al., *J. Neurosci.*, 1986, **6**, 2730-2735.
14. H. Tostivint et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 12605-12610.

35 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre ni de la portée de la présente invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REVENDECATIONS

1°) Polypeptides, isolés de mammifères, caractérisés en ce qu'ils comprennent à leur extrémité C-terminale un heptapeptide présentant la séquence suivante : Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Xaa dans laquelle Xaa représente Val ou Ile, en ce qu'ils appartiennent à la famille des urotensines II et en ce qu'ils présentent au moins 45 %, et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:1, correspondant à la prépro-urotensine II humaine.

2°) Polypeptides de mammifères selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitués par les séquences humaines SEQ ID NO:1-3, par les séquences de rat SEQ ID:30-32 et par les séquences de souris SEQ ID NO:33-35.

3°) Fragments d'acides nucléiques purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

a) les fragments comprenant au moins une séquence codant pour un polypeptide selon la revendication 1 ou la revendication 2,

b) les fragments constitués par une séquence codant pour un polypeptide selon la revendication 1 ou la revendication 2,

c) les oligonucléotides issus des séquences telles que définies en b), constituant des sondes ou des amorces, et

d) les séquences complémentaires des séquences précédentes, sens ou antisens,

à l'exception de l'EST ayant pour numéro d'accèsion Gen Bank, le n°AA535545.

4°) Fragments d'acides nucléiques selon la revendication 3, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:4-6, les séquences SEQ ID NO:18-20 et les séquences SEQ ID NO:27-29.

5°) Vecteurs recombinants caractérisés en ce qu'ils contiennent un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

6°) Cellules transformées par au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4.

7°) Réactif de détection d'un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend entre 20 et 50 nucléotides de la séquence SEQ ID NO:4, de la séquence SEQ ID NO:18 ou de la séquence SEQ ID NO:27.

8°) Réactif selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un fragment de la séquence codant pour la prépro-urotensine II humaine, codant pour un dipeptide (Pro-Tyr), en amont du site de clivage tribasique,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

lui-même situé juste en amont de la séquence codant pour l'urotensine II humaine et spécifique de ladite séquence humaine ;

- des fragments, aptes à servir d'amorces : SEQ ID NO:7 et NO:8, SEQ ID NO:10-17 ; SEQ ID NO:21-26 ; SEQ ID NO:36-42, et

5 - des fragments, aptes à servir de sondes : séquence SEQ ID NO:4 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:4 ; séquence SEQ ID NO:18 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:18 et séquence SEQ ID NO:27 et les fragments constitués de 20 à 50 nucléotides de ladite séquence SEQ ID NO:27.

10 9°) Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 ou une séquence d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 3 et 4 codant pour tout ou partie desdits polypeptides, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 10°) Utilisation de polypeptides appartenant à la famille de l'urotensine II ou de séquences nucléiques codant pour lesdits polypeptides, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives de la moelle épinière ou les traumatismes de la moelle épinière.

20 11°) Procédé de détection de la présence ou de l'absence d'un ARNm codant pour une urotensine II de mammifère, notamment chez des sujets présentant une pathologie neurodégénérative ou un traumatisme de la moelle épinière par mise en contact d'un échantillon biologique avec au moins un réactif selon la revendication 7 ou la revendication 8.

25 12°) Procédé de détection d'une mutation dans la séquence du gène ou de l'ARNm codant pour l'urotensine, caractérisé en ce qu'il comprend l'extraction dudit ADN ou dudit ARNm à partir d'un échantillon biologique et sa comparaison avec les séquences d'acides nucléiques selon la revendication 3 ou la revendication 4.

30 13°) Kit de diagnostic destiné à la détection d'un ARNm codant pour une urotensine II de mammifère dans un échantillon biologique, ledit ARNm étant éventuellement muté, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4.

14°) Utilisation des polypeptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, pour la sélection d'anti-hypertenseurs.

THIS PAGE BLANK (USPTO)